

Universität Zürich
Zentrum für Zahnmedizin
Klinik für Präventivzahnmedizin, Parodontologie und Kariologie
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Thomas Attin

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. dent. P. Schmidlin
und Dr. sc. nat. T. Thurnheer

Wirkung von Ultraschall auf einen in vitro supragingivalen Biofilm

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Elodie Rohrer
von Eiken AG

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. dent. Patrick Schmidlin
Zürich 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	4
3. Material und Methoden	6
4. Resultate	10
5. Diskussion	12
6. Tabellen und Abbildungen	15
Literaturverzeichnis	20
Glossar	23
A. Anhang	24
B. Lebenslauf	29

1. Zusammenfassung

1.1. Hintergrund und Zielsetzung

Bisher liegen wenige wissenschaftliche Arbeiten über die direkte Wirkung von Ultraschall auf einen oralen Biofilm vor. Das Ziel dieser Arbeit war die Kapazität zur Loslösung von Bakterien aus einem Biofilm zweier Ultraschallansätze unter standardisierten Verhältnissen in einem Multispezies-Biofilmmodell zu visualisieren.

1.2. Materialien und Methoden

Auf Hydroxyapatit-Discs wurde ein Biofilm mit sechs Bakterienstämmen gezüchtet. Dieser wurde jeweils 15 Sekunden lang unter standardisiertem Druck von 40 Gramm mit einem piezoelektrischen und einem magnetostriktiven Ultraschallgerät behandelt. Die Ultraschallscaler wurden jeweils mit der Spitze oder mit der Seite nach unten benutzt. Der Überstand wurde auf die losgelöste Bakterienanzahl mittels CFU nach 72 Stunden Inkubationszeit geprüft. Unbehandelte Proben dienten als Kontrolle. Darüber hinaus wurden der verbleibende respektive entfernte angefärbte Biofilm der behandelten Hydroxyapatit-Discs mit einem CLSM-Mikroskop bildlich dargestellt.

1.3. Resultate

Ein in vitro Biofilmmodell kann hilfreich sein, um die Wirksamkeit von Ultraschallscalern unter standardisierten Verhältnissen zu untersuchen. Die folgende Studie lieferte den Hinweis, dass die Art und Weise der Benutzung sowie die Scalerform eine Rolle bezüglich der Wirksamkeit für die Biofilmloslösung haben.

1.4. Schlussfolgerung

Dieses Modell kann künftig dazu dienen, die Effizienz von Ultraschallinstrumenten unter standardisierten Bedingungen mit verschiedenen Settings (z.B. Druckanwendung, Scalerform etc.) zu untersuchen.

2. Einleitung

Ultraschall wird bei jeder konventionellen Zahnreinigung eingesetzt, um supra- und subgingivalen Zahnstein zu entfernen. Bis heute gilt die mechanische Zahnreinigung mit Ultraschall zur wichtigsten Therapieform der Parodontitis, um die Entzündung im zahntragenden Hart- und Weichgewebe zu behandeln. Neben dem traditionellen Weg der Zahnreinigung durch Handküretten hat sich die Zahnreinigung durch Ultraschall als eine gut dokumentierte und effektive Behandlungsmethode durchgesetzt (Arabaci et al. 2007). Hierbei wird der Zahnstein durch Vibrationen der Arbeitsspitze des Ultraschallgeräts entfernt (Roulet & Zimmer 2002, Badersten et al. 1981). Diese Mikrobewegungen der Metallspitze werden durch sogenannte Kavitations- und Mikro- Streaming Effekte verstärkt, welche zu Flüssigkeitsbewegungen und Blasenbildung um die Region der Arbeitsspitze führen. Damit ist man in der Lage, den Biofilm zu lösen, zu desintegrieren oder gar Bakterien zu zerstören (Walmsley et al. 2013).

Dabei spielt die Erzeugung von Schallwellen eine wichtige Rolle, welche beispielsweise durch Schwingungen von Festkörpern erzeugt werden. Bei Ultraschallgeräten werden piezoelektrische und magnetostruktive Ultraschallquellen verwendet. Zu den handelsüblichsten Ultraschallgeräten in der Schweiz gehören das Cavitron-Gerät der Firma Dentsply sowie das Piezon der Firma EMS (Electro Medical Systems). Bei beiden Geräten gibt der Metallansatz den Ultraschall auf die zu reinigende Oberfläche ab. Für die vorliegenden Versuche wurden diese beiden Geräte benutzt. Nachfolgend sind ein paar Informationen zur unterschiedlichen Funktionsweise dargestellt:

Das Dentsply-Cavitron ist ein magnetostruktives Ultraschallgerät. Ein magnetostruktiver Ultraschallgeber besteht dabei aus einem Stab aus ferromagnetischem Material, welcher sich innerhalb einer Spule befindet. Fließt ein Strom durch letztere, wird ein Magnetfeld parallel zur Spulenachse erzeugt und der Stab dehnt sich aus oder schrumpft je nach Material. Beim Anlegen eines Wechselstroms wechselt daher die Richtung des Magnetfeldes und eine Schwingung des Stabes entsteht. Diese Geräte haben in der Regel eine metallene Spitze, welche vorwiegend elliptische Schwingungen erzeugt. Die Schwingungsfrequenzen variieren zwischen 25 und 30 kHz.

Im Gegensatz dazu besitzen piezoelektrische Geräte wie das Piezon von EMS Piezokristalle, welche lineare Schwingungen erzeugen, wenn man den Kristall an einen Wechselstrom anhängt. Sie arbeiten in der Regel bei Frequenzen zwischen 32 und 35 kHz. Aufgrund der eher linearen Schwingungen sollten die Arbeitsspitzen wenn möglich par-

allel zum Zahn benutzt werden, damit die Enden nicht permanent an den Zahn „hämmern“ (Arabaci et al. 2007, Hehl 2003, Roulet & Zimmer, Walmsley et al. 2008).

Verschiedene Faktoren welche die Bewegungen der Ultraschallgeräte beeinflussen wurden beschrieben: Die applizierte Kraft, die Generatorleistung sowie die Menge des zugeführten Kühlwassers spielen eine Rolle (Lea et al. 2002, 2006 und 2009). Weitere Faktoren sind das Design und die Länge der Arbeitsspitze, welche die Effizienz des Scalers verändern können. Aber vor allem beeinflusst die applizierte Kraft die Produktion der Kavitation an der klinisch am meisten Relevanten Stelle - der Scalerspitze (Walmsley et al. 2013).

Während die mechanischen Eigenschaften von Ultraschallgeräten unter verschiedenen Laborsituationen erforscht wurden, ist es immer noch schwierig, die Effizienz des Ultraschalls bezüglich Biofilmentfernung abzuschätzen (Müller et al. 2011). Deswegen wurden in der vorliegenden Studie mit einem Biofilmmodell die Unterschiede bezüglich Abtragungseffizienz vor und nach Ultraschallbehandlung mit konfokaler Lasermikroskopie und Bakterienkulturen bestimmt. Die Hypothese war, dass die Ausrichtung und Form der Arbeitsspitze sowie die Art der Energieübertragung einen Einfluss auf die Effizienz der Biofilmaustragung haben.

3. Material und Methoden

Eine Liste aller verwendeten Materialien und die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen ist im Anhang (Seite 24) aufgeführt.

3.1. Herstellung der Biofilme

Für die Ultraschall-Versuche wurden - nach dem sogenannten „feeding“-Biofilmmodell des Instituts für Orale Mikrobiologie und Immunologie der Universität Zürich - supragingivale 6-Spezies Biofilme auf Hydroxyapatit-Discs (HA; \varnothing 9 mm) gezüchtet (Thurnheer et al. 2006). Die Biofilme bestanden aus fünf oralen Bakterienspezies, *Actinomyces oris* OMZ 745, *Fusobacterium nucleatum* OMZ 598, *Streptococcus mutans* OMZ 918, *Streptococcus oralis* OMZ 607, *Veillonella parvula* OMZ 493 und der Hefe *Candida albicans* OMZ 110. Jeweils am Freitagabend wurden die Bakterienstämme für die Vorkulturen auf Blutagarplatten (Columbia Blood Agar, CBA mit 5 % Humanblut) transferiert und anaerob bei 37°C inkubiert; *C. albicans* wurde aerob mit 10 % CO₂ bei 37°C angezüchtet. Am Montagabend wurden alle Stämme von den Blutagarplatten in flüssiges FUM-Medium, welches 0.3 % Glucose enthielt, transferiert. Da *V. dispar* Glucose nicht fermentieren kann, enthielt das Medium zusätzlich 1 % Natriumlactat. Die Stämme wurden über Nacht bei 37°C anaerob inkubiert, mit Ausnahme von *C. albicans*, welcher aerob inkubiert wurde. Am Dienstagmorgen wurden die Stämme in frisches Medium transferiert und maximal 7 Stunden bei 37°C unter anaeroben Bedingungen gelagert (Ausnahme wiederum *C. albicans*, siehe oben). Nach dieser Inkubation wurden die Stämme in Bezug auf Entwicklung und Kontaminationen visuell und mikroskopisch untersucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Stämme bei 4°C aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurden die HA-Discs in 800 μ l aufbereiteten Speichel gegeben und während 4 Stunden bei Raumtemperatur unter konstanter kreisender Bewegung (95 rpm) zur Bildung des Pellikels gelagert. Vor Beginn des eigentlichen Biofilm-Experiments wurde jede Bakteriensuspension auf eine optische Dichte (gemessen bei 550 nm) von 1.0 eingestellt. Zur Qualitätskontrolle wurden Verdünnungsreihen in 0.9 % NaCl von den Bakteriensuspensionen hergestellt und auf CBA mit 5 % Humanblut ausgestrichen und während 72 h anaerob (*C. albicans* aerob) inkubiert. Am Dienstagnachmittag wurden die HA-Discs mit dem gebildeten Pellikel in 24-Well-Zellkulturschalen überführt, welche pro Loch 480 μ l vorreduzierten, aufbereiteten Speichel mit 1120 μ l Medium 1 (FUM + 0.3 % Glucose) enthielt. Der Versuch

wurde gestartet durch Zugabe von 200 μl des Bakteriengemischs, welches aus gleichen Volumenanteilen der verschiedenen Bakteriensuspensionen bestand. Danach wurden die Zellkulturschalen 45 min bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Während dieser ersten Fütterung (feeding) fand die erste Biofilmbildung auf den HA-Discs statt. Nach diesen 45 Minuten wurden die Discs jeweils dreimal in 2 ml frischer physiologischer Kochsalzlösung durch zweimaliges Eintauchen pro Loch gewaschen. Dadurch wurden lose Bakterien ausgewaschen. Danach wurden die Discs in 1600 μl frisch aufbereiteten Speichel, welcher zuvor anaerob bei 37°C vorreduziert wurde, gegeben. Am Mittwoch, nach 16-stündiger anaerober Inkubation, wurden die Discs in 1120 μl vorreduziertes Medium 2 (FUM + 0.15 % Glucose + 0.15 % Saccharose) und 480 μl aufbereiteten Speichel transferiert. Diese zweite Fütterung wurde wiederum anaerob durchgeführt und dauerte wieder 45 min. Danach wurden die Discs wie oben beschrieben in frischer Kochsalzlösung gewaschen und in 1600 μl vorreduzierten frischen und aufbereiteten Speichel gegeben. Fünf weitere Fütterungen fanden nach 20, 24, 40, 44 und 48 Stunden Inkubationszeit statt. Nach der 7. und letzten Fütterung wurden die Discs nochmals während 16 h in vorreduziertem, frischen Speichel anaerob bei 37°C gelagert.

3.2. Behandlung und Ernte der Biofilme

Nach 64 h Inkubationszeit wurden die Biofilme wie oben beschrieben 3x in frischer physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und danach mit zwei verschiedenen Ultraschallgeräten behandelt, mit einem piezoelektrischen (EMS) und einem magnetostruktiven (Dentsply). Jede Disc wurde 15 Sekunden lang unter standardisiertem Druck behandelt. Gemäss dem Schema in Abb. 6.1 wurde die Ultraschallspitze einmal horizontal und einmal senkrecht auf die zu behandelnden Discs gelegt. In Abb. 6.2 & 6.3 ist die Versuchsanordnung dargestellt. Die Discs wurden auf einen Teflon-Halter gelegt und in einer 24-Lochplatte gegeben. In jedem Loch befanden sich 1.6 ml physiologische NaCl-Lösung. Um den Druck während der Behandlung einstellen zu können, befand sich die Zellkulturschale mit dem Halter auf einer speziellen Waage (Abb. 6.2). Für die Behandlung mit Ultraschall (Abb. 6.3) wurden jeweils drei Discs auf den Teflon-Halter gelegt und nacheinander während 15 Sekunden mit der Spitze behandelt. Während der Behandlung wurde mit 40 g gedrückt. Die nächsten drei Discs wurden 15 sec mit der Seite desselben Scalers wiederum mit 40 g behandelt. Dasselbe Verfahren wurde mit beiden Geräten durchgeführt. Nach jeder Behandlung wurden die Discs vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung Lösung gespült. Das jeweilige Endvolumen der Biofilm-Suspension betrug jeweils 1.6 ml. Als Kontrolle dienten drei Discs mit unbehandeltem Biofilm, welche nur gespült aber nicht mit Ultraschall behandelt wurden und anschliessend manuell mit einem sterilen Plastikscaler von den Discs entfernt wurden. Hier betrug das Endvolumen der Biofilm-Suspension jeweils 1 ml. Alle Discs (als Kontrolle zusätzlich noch mit

unbehandeltem Biofilm, welcher nicht abgekratzt worden war) wurden für die spätere Analyse der Topografie des verbleibenden Biofilms mit konfokaler Mikroskopie (CLSM) weiterverarbeitet (siehe unten). Von den Biofilm-Suspensionen wurde die Gesamtkeimzahl (CFU, colony forming units) mit konventionellen Kulturmethoden bestimmt.

3.3. Aufbereitung der Stämme

Die Biofilm-Suspensionen wurden 5 Sekunden mit Ultraschall (Stufe 4, 30 Watt) dispergiert. Zur Beurteilung der Biofilm-Suspension mit einem Live/Dead-Test (LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Zug, Schweiz) wurden jeweils 25 µl Biofilmsuspension benötigt, welche auf einen Objektträger pipettiert wurden. Danach wurden 0.5 µl des Live/Dead-Gemischs (Stammlösung A+B gemäss Angaben des Herstellers) zur Färbung der Bakterien dazugeben. Die Objektträger wurden 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Bakterien unter dem fluoreszierenden Mikroskop ausgezählt, damit die Verdünnungsreihen für die Biofilm-Suspensionen bestimmt werden konnten. Für die Kulturen wurden 50 µl der jeweiligen Biofilm-Suspension benötigt. Die Verdünnungsreihen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung angefertigt und in den jeweiligen Verdünnungen (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5}) auf Blutagarplatten ausplattiert. Letztere wurden 72 Stunden bei 37°C unter anaeroben Bedingungen gelagert. Nach diesen 72 Stunden konnten die Platten beurteilt und ausgezählt werden.

3.4. Färbung der Biofilme

Zur Visualisierung mit konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM) wurden die Biofilme entweder mit einem Gemisch von 3 µM YoPro-1 Iodid (Invitrogen) und 15 µM Sytox green (Invitrogen) in 0.9 % NaCl oder mit dem Live/Dead Viability Kit (Invitrogen) gefärbt. Die beiden Komponenten Syto 9 und Propidiumiodid des Live/Dead-Kits wurden 1:1 gemischt und danach 1:100 in 0.9 % Kochsalzlösung verdünnt. Für die Färbung wurde ein Tropfen von 20 µl der Färbelösung auf jeden Biofilm gegeben und während 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Biofilme wurden danach in 0.9 % NaCl gewaschen und in Mowiol 4-88 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, USA) eingebettet.

3.5. CLSM und Bildanalyse

Die gefärbten Biofilme wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (Leica TCS SP5 Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Deutschland) mit einem x20 Ölimmersions-Objektiv (Numerische Apertur: 0.8) analysiert. Für den Live-Farbstoff (Sy-

to 9) wurden die Anregungs- bzw. Emissionsfilter auf 488 und 530 nm gesetzt, respektive auf 561 und 640 nm für den Dead-Farbstoff (Propidiumiodid). Die Erfassung der Bilder erfolgte im 6-line average Modus und die Daten wurden mit der Imaris 7.2.2 Software (Bitplane AG, Zürich) bearbeitet.

3.6. Statistische Methoden

Die Daten wurden im Excel kodiert und mit SPSS Version 20 analysiert. Die deskriptiven Statistiken (Mittelwerte und Standardabweichung) wurden berechnet. Die Überprüfung der Normalverteilung erfolgte mit einem Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Unterschiede im Überstand zwischen den Testgruppen erfolgte mit der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Scheffé-Post-Hoc-Test. Die zweifache Varianzanalyse wurde angewandt, um den Einfluss von beiden Faktoren (Hersteller und Ultraschall) auf den Überstand zu untersuchen. Die Differenz zwischen Disc und Überstand wurde berechnet und ebenfalls mit einer deskriptiven Statistik und dem Kolmogorov-Smirnov-Test analysiert. Ferner wurde der gepaarte t-Test angewandt. Die Ergebnisse der statistischen Analysen mit einem p -Wert kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant interpretiert.

4. Resultate

Der Kolomogorov-Smirnov-Test ergab, dass die Nullhypothese, welche besagte, dass alle Gruppen der Normalverteilung folgten, nicht verworfen werden musste, d.h. die Daten von jeder Behandlung normal verteilt waren. Zur Beurteilung, ob die Behandlungen mit Ultraschall einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zeigten, konnte daher die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet werden. Diese ergab, dass die Variablen zwischen den jeweiligen Herstellern ($p = 0.076$) und die Interaktion zwischen Hersteller und Ultraschall ($p = 0.081$) nicht signifikant waren. Jedoch war die Variable, ob Ultraschall von der Seite oder mit der Spitze ($p = 0.041$) benutzt wurde, statistisch signifikant, unabhängig davon, welcher Hersteller benutzt wurde. Das Resultat unabhängig der Interaktion bleibt gleich (Tab. 2). Der anschliessend durchgeführte Scheffé-Post-Hoc-Test zeigte, dass nur zwischen den Gruppen „Kontrolle“ und „Cavitron Side“ eine statistische Signifikanz bestand ($p = 0.005$; Tab. 3). In Abb. 6.4 sind die Resultate zusätzlich als Boxplots dargestellt. Dabei gaben die Resultate - von links nach rechts betrachtet - zuerst die „Kontrolle Biofilm“ in CFU an, welche manuell von den Discs entfernt werden konnten, die „Kontrolle Überstand“ die CFU, welche durch die Manipulation des Spülens eliminiert wurden und danach die CFU, welche durch die beiden Ultraschallgeräte bei Anwendung jeweils von der Seite oder mit der Spitze entfernt worden waren.

In Abb. 6.6 sind konfokale Aufnahmen vor und nach Ultraschallbehandlung dargestellt (die Bilder stammen von der 3. Wiederholung). Die breiten Streifen stellen einen Ausschnitt des Biofilms auf dem Durchmesser der Rondelle von oben gesehen her dar, in ca. $5\text{ }\mu\text{m}$ Abstand von der Oberfläche der Rondelle. Der schmale Streifen darunter stellt den Seitenriss des Biofilms dar, welcher die Höhe des Biofilms anzeigt. Anhand der Live/Dead-Färbung ist ersichtlich, dass die Ultraschall-Behandlung keinen negativen Einfluss (ausser in Bild F) auf die Vitalität der Mikroorganismen im Biofilm hatte. Bild A zeigt den unbehandelten Kontrollbiofilm. Die Hydroxyapatit-Disc war durchgehend mit einem dichten Biofilm besiedelt. Die Dicke des Biofilms betrug im ersten Experiment $40\text{ }\mu\text{m}$, im zweiten Experiment $35\text{ }\mu\text{m}$ und im dritten Experiment $38\text{ }\mu\text{m}$. Dies ergab im Durchschnitt also $37.7\text{ }\mu\text{m}$. In Bild B ist der Biofilm nach der manuellen Behandlung dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass praktisch der komplette Biofilm geerntet werden konnte. Die Bilder C und D zeigen die Biofilme nach Behandlung mit EMS Scaler. Bei der Behandlung mit der Spitze (C) war nur gerade im Zentrum der Discs kein Biofilm mehr vorhanden, der Wirkungsradius war etwas kleiner als bei den Rondellen in D, E und

F. Bei der Behandlung von der Seite (D) hingegen war im Zentrum der Discs kein Biofilm mehr vorhanden, der Wirkungsradius war etwas grösser als bei Disc C, jedoch kleiner als bei E und F. In den Bildern E und F sind die Biofilme nach Behandlung mit dem Cavitron Scaler zu sehen. Bei der Behandlung mit der Spitze (E) war im Zentrum der Disc kein Biofilm mehr vorhanden. Der Wirkungsradius war etwas kleiner als bei der Disc F, jedoch grösser als bei C und D. Bei der Behandlung von der Seite (F) war im Zentrum der Discs wiederum kein Biofilm mehr vorhanden. Der Wirkungsradius war aber etwas grösser als bei den Discs E, C und D.

5. Diskussion

Ultraschall wird seit fast 50 Jahren in der Zahnmedizin verwendet. Hauptsächlich wird es dazu genutzt, um an den Zähnen Plaque und Zahnstein zu entfernen (Lea et al. 2004). Supra und subgingivaler Zahnstein führt zu einer Entzündung des Zahnfleisches und kann zu einer Parodontitis führen. Bleibt dieser Zustand unbehandelt, kann es zum Verlust der Zähne führen (Tunkel et al. 2002, Leonhardt et al. 2007). Obwohl supra- und subgingivales Scaling die Bakterienkeimzahl verringert, werden die parodontalen Taschen häufig rekolonisiert. Deswegen gehört regelmässiges subgingivales Debridement zur Behandlung der Parodontose (Flemming et al. 1998, Renvert et al. 1990, Sbordone et al. 1990). Mit Ultraschall ist es möglich Zahnstein und Plaque vom Zahn zu lösen (Walmsley et al. 2008) aber nur wenige Arbeiten sind bekannt, welche die Menge der losgelösten Bakterien aufzeigten. Ziel dieser Arbeit war es deshalb den direkten Einfluss von Ultraschall auf den Biofilm aufzuzeigen. In dieser Arbeit wurde dies mit Hilfe der Ausplattierung einer Verdünnungsreihe aus dem Überstand und nachträglicher Auszählung der Kolonien nach 72h Inkubation durchgeführt. Zusätzlich wurden die Biofilme auf den Hydroxyapatitplättchen aus dem Versuch mit einer sogenannten Live/Dead Färbung und CLSM-Mikroskopie bildlich visualisiert. Generell besteht noch ein grosser Bedarf zur Beurteilung und Standardisierung der Ultraschallbehandlung und zur Bewertung der Reinigungseffizienz. Nur wenige Publikationen zu dieser Thematik sind bis dato verfügbar (Oulahal et al. 2004).

Als wichtigste Erkenntnis aus dieser Studie kann entnommen werden, dass nur die Seitenapplikation des magnetostriktiven Ultraschalls verglichen mit der manuell behandelten Kontrolle imstande war, eine beträchtliche Menge Bakterien des Hydroxyapatitdiscs zu entfernen. Die Applikation mit der Ultraschallspitze sowohl bei dem magnetostriktiven wie auch beim piezoelektrischen Ultraschall entfernte eine signifikant kleinere Menge Bakterien aus dem Biofilm wie sowohl anhand der CFU-Bestimmung als auch durch CLSM visualisiert wurde.

Der in dieser Studie verwendete in vitro Biofilm ist ein gut bewährtes und validiertes Biofilmmodell, bestehend aus sechs Spezies, welche für eine supragingivale Plaque charakteristisch sind (Guggenheim et al. 2001 und 2004). Dieses Modell hat nachweislich belegt, dass wiederholbare Resultate auf unterschiedlichen Materialien erfolgreich erhalten wurden, auch um antimikrobielle Effekte in vitro zu testen (Shapiro et al. 2002, Müller et al. 2007, Dezelic et al. 2009). Obwohl dieses Modell ein vereinfachtes Laborplaquemodell darstellt, imitiert der Komplex die in vivo Situation präziser als ein Mono-Spezies

Biofilmmodell. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein „gefüttertes“ Biofilmmodell angewendet, das heisst, der Biofilm war von klebriger Konsistenz auf Grund einer gesteigerten Matrixbildung. Daher war die Konsistenz und Haftung eher mit einer natürlichen Plaque zu vergleichen.

In Bezug auf die Kapazität zur Entfernung von Bakterien aus dem Biofilm hat eine kürzlich publizierte Studie vergleichbare Zahlen kultivierter Bakterien auf unbehandelten Proben zur Erforschung der Kolonisation und zur Messung der totalen Kolonisierung ergeben (Müller et al. 2011). Dies wiederum zeigt die Reproduzierbarkeit dieses Modells bezüglich des Biofilmwachstums. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Effizienz zur Biofilmentfernung auch von der angewandten Methode abhängig ist. Die Behandlung mit Ozonen und photodynamischer Therapie zum Beispiel zeigte nur geringe Effekte auf den verbleibenden Biofilm (Müller et al. 2007). Die beobachtete Reduktion betrug bei diesen Behandlungsmethoden weniger als ein \log_{10} Schritt. In einer anderen Studie, in der die Effizienz von Schockwellen untersucht wurde, war die effektive Abtragung in der Grössenordnung von drei \log_{10} Schritten unter Verwendung eines magnetostrictiven Ultraschallgerätes (Müller et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurden die verbleibende Biofilmstruktur auf der Hydroxyapatitdisc sowie die Zahl der losgelösten Bakterien untersucht. Da allerdings nur lebende Bakterien ermittelt wurden, kann man den Schluss nur basierend auf die Viabilität nach Behandlung schliessen und nicht auf die Loslösung aus dem Biofilm per se. Tote Bakterien könnten nach der Behandlung ebenfalls von der Hydroxyapatitfläche losgelöst worden sein, wurden jedoch eventuell nicht von der CFU-Auszählung erfasst. Daher musste zusätzlich mit einer Live/Dead Färbung und CLSM weitergearbeitet werden, um den verbleibenden Biofilm auf der Oberfläche zu identifizieren.

Walmsley et al. untersuchten das Auftreten der Kavitation um die Scalerspitzen unter Belastung (Walmsley et al. 2013). Die Vibrationsamplitude von Ultraschallscalern vergrösserte sich im gleichen Ausmass wie das Auftreten der Kavitation, jedoch beeinflussten Faktoren wie die Länge der Probe die Grösse der auftretenden Kavitation. Generell wurde unter Belastung (Druckanwendung) beim Ultraschall die Kavitation an der klinisch am meisten relevanten Stelle, der Spitze, produziert. In der jetzigen Studie wurde ein standardisierter Druck von 40 g eingesetzt. Walmsley et al. haben aufgezeigt, dass magnetostrictive Scaler mehr oszillieren als piezoelektrische Ansätze und Geräte, trotzdem haben beide Scaler in der Versuchsreihe ähnliche Defekte aufgezeigt. Der Grund könnte in der Form des Querschnitts der Scalers sein (Lea et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden dieselben Geräte und Scalerspitzen benutzt wie in der vorher erwähnten Arbeit und zeigten ähnliche Resultate.

Spätere Studien könnten dieses Biofilmmodell nutzen, um die Effizienz von Ultraschall unter verschiedenen Druckanwendungen, Scalerformen oder anderen Parametern zu untersuchen. Allerdings sollte beachtet werden, dass die Art wie die Proben in der Versuchs-

anordnung eingebettet und befestigt werden die Weiterleitung der Vibration und somit die Effizienz des Scalers beeinflussen können. Das Material der Discs kann ebenso eine wichtige Rolle spielen. In der vorliegenden Studie wurden Hydroxyapatitdiscs verwendet. Jedoch kann jedes beliebige Material wie zum Beispiel Dentin, Schmelz oder Titan benutzt werden, um die Wirkung auf Biofilme zu studieren.

6. Tabellen und Abbildungen

Disc	Kontrolle Biofilm	Kontrolle Überstand ¹	EMS Side	EMS Top	Cavitation Side	Cavitation Top
Disc 1 / 1.Exp.	7.60E+07	1.80E+06	6.20E+07	3.00E+07	6.10E+07	4.90E+06
Disc 2 / 1. Exp.	5.00E+07	5.40E+07	4.10E+07	1.80E+07	3.50E+07	2.30E+07
Disc 3 / 1. Exp.	1.00E+08	7.60E+05	3.60E+07	4.00E+07	5.10E+06	2.20E+07
Disc 4 / 2. Exp.	4.90E+08	3.30E+06	5.80E+07	3.60E+07	3.80E+08	8.20E+07
Disc 5 / 2. Exp.	2.40E+08	9.50E+05	6.70E+07	3.60E+07	2.80E+08	8.50E+07
Disc 6 / 2. Exp.	2.60E+08	1.80E+07	5.60E+07	4.80E+07	2.10E+08	1.40E+08
Disc 7 / 3. Exp.	1.50E+09	1.10E+07	1.30E+08	2.40E+08	9.70E+07	9.10E+07
Disc 8 / 3. Exp.	9.50E+08	6.70E+06	1.80E+08	9.70E+07	7.80E+08	1.40E+08
Disc 9 / 3. Exp.	1.20E+09	2.70E+07	1.90E+08	1.40E+08	4.70E+08	1.10E+08

Tab. 6.1.: Kolonie-bildende Einheiten (CFUs) der Biofilme vor und nach der Ultraschall-Behandlung.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Überstand					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,103E+17 ^a	3	7,009E+16	3.709	.021
Intercept	5,678E+17	1	5,678E+17	30.047	.000
Hersteller	6,342E+16	1	6,342E+16	3.356	.076
Ultraschall	8,558E+16	1	8,558E+16	4.529	.041
Hersteller * Ultraschall	6,127E+16	1	6,127E+16	3.243	.081
Error	6,047E+17	32	1,890E+16		
Total	1,383E+18	36			
Corrected Total	8,149E+17	35			

a. R Squared = .258 (Adjusted R Squared = .188)

Tab. 6.2.: Varianzanalyse zum Vergleich der Effekte zwischen den Herstellern und der Interaktion mit Ultraschall.

¹Zusätzlich sind die CFUs des Überstandes der unbehandelten Biofilme aufgelistet. Daraus ist ersichtlich, dass allein durch die Manipulation des Waschens der Biofilme im Durchschnitt weniger als 2.5 % der Gesamtkeimzahl weggespült wurde.

Post Hoc Tests

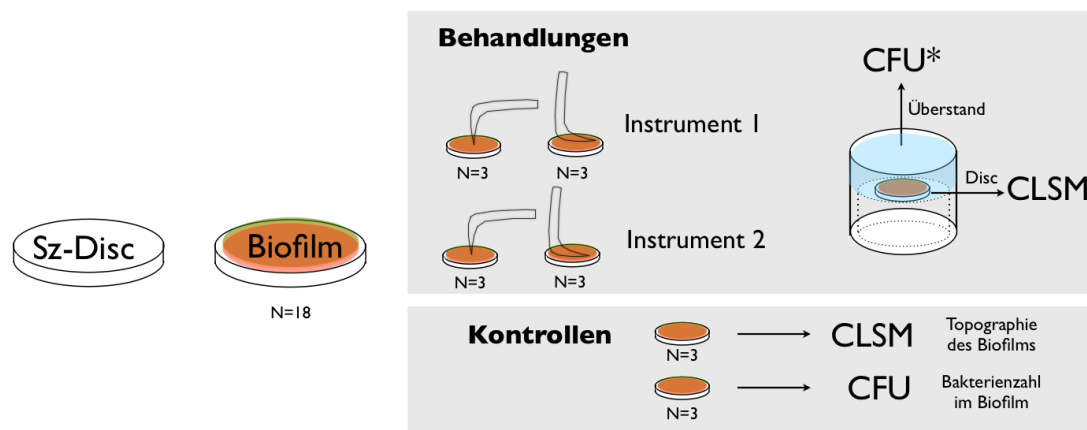
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Überstand
Scheffe

(I) Gruppe	(J) Gruppe	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrolle Biofilm	EMS Seite	-77387777,78	58076184,22	.776	-264892922,4	110117366,9
	EMS Top	-62387777,78	58076184,22	.884	-249892922,4	125117366,9
	Cavitron Seite	-243843333*	58076184,22	.005	-431348478,0	-56338188,69
	Cavitron Top	-63821111,11	58076184,22	.875	-251326255,8	123684033,5
EMS Seite	Kontrolle Biofilm	77387777,78	58076184,22	.776	-110117366,9	264892922,4
	EMS Top	15000000,00	58076184,22	.999	-172505144,6	202505144,6
	Cavitron Seite	-166455555,6	58076184,22	.105	-353960700,2	21049589,09
	Cavitron Top	13566666,67	58076184,22	1.000	-173938478,0	201071811,3
EMS Top	Kontrolle Biofilm	62387777,78	58076184,22	.884	-125117366,9	249892922,4
	EMS Seite	-15000000,00	58076184,22	.999	-202505144,6	172505144,6
	Cavitron Seite	-181455555,6	58076184,22	.062	-368960700,2	6049589,09
	Cavitron Top	-1433333,333	58076184,22	1.000	-188938478,0	186071811,3
Cavitron Seite	Kontrolle Biofilm	243843333,3*	58076184,22	.005	56338188,69	431348478,0
	EMS Seite	166455555,6	58076184,22	.105	-21049589,09	353960700,2
	EMS Top	181455555,6	58076184,22	.062	-6049589,09	368960700,2
	Cavitron Top	180022222,2	58076184,22	.066	-7482922,42	367527366,9
Cavitron Top	Kontrolle Biofilm	63821111,11	58076184,22	.875	-123684033,5	251326255,8
	EMS Seite	-13566666,67	58076184,22	1.000	-201071811,3	173938478,0
	EMS Top	1433333,333	58076184,22	1.000	-186071811,3	188938478,0
	Cavitron Seite	-180022222,2	58076184,22	.066	-367527366,9	7482922,42

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tab. 6.3.: Scheffé-Post-Hoc Test zum Vergleich der Effekte zwischen den Interaktionen mit Ultraschall.



* Die CFU im Überstand können direkt unter den Behandlungsmethoden verglichen werden (Effektivität).
Die Differenz aus den CFU in den unbehandelten Kontrollen ermöglicht eine Aussage über den Anteil entfernter Bakterien.

Fig. 6.1.: Schema für die Behandlungsweisen der Biofilme mit Ultraschall-Scalern.

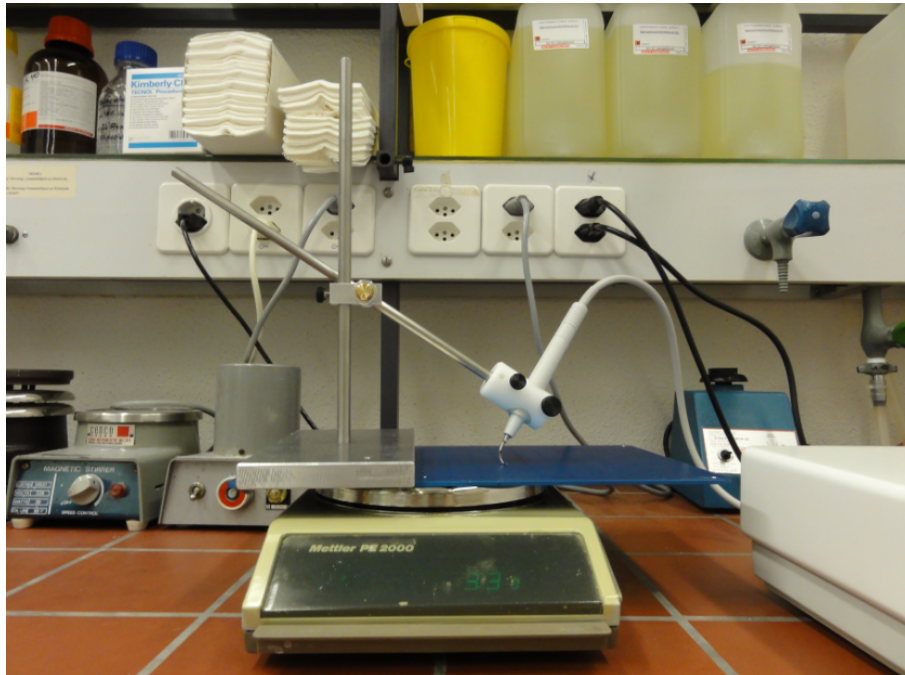


Fig. 6.2.: Versuchsanordnung für die Behandlung der Discs.

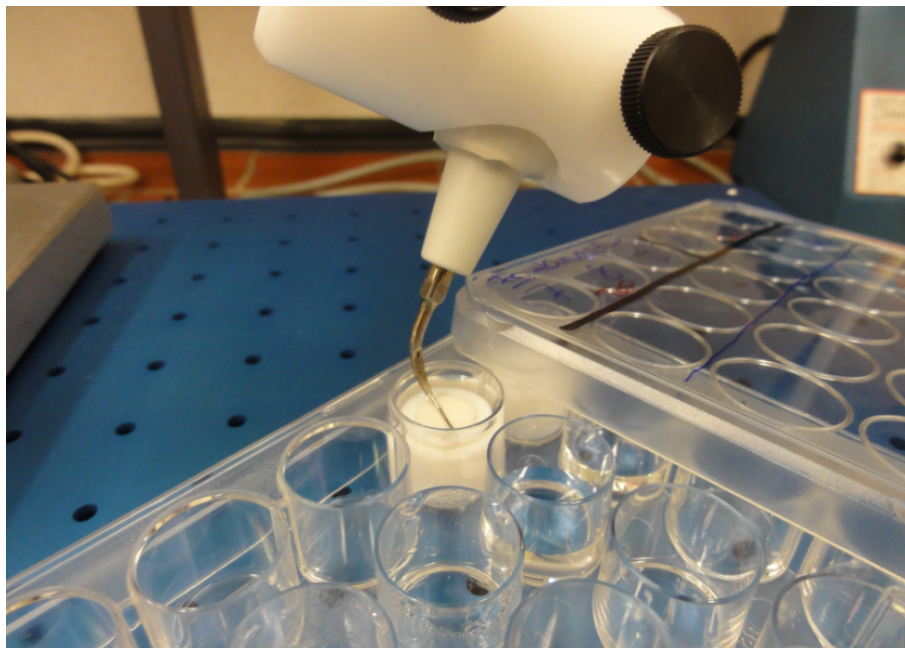


Fig. 6.3.: Eine Disc wird mit EMS Ultraschall behandelt.

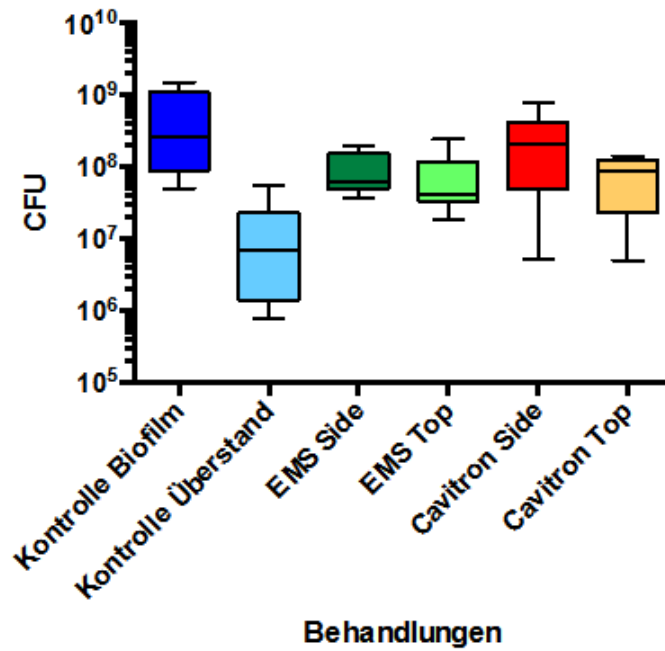


Fig. 6.4.: Boxplots zum Vergleich der CFUs der verschiedenen Behandlungen. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Sie wird durch das obere und das untere Quartil (75 bzw. 25 %) begrenzt. Der Strich in der Box repräsentiert den Median und die sog. Whiskers stellen den grössten bzw. kleinsten Wert dar.

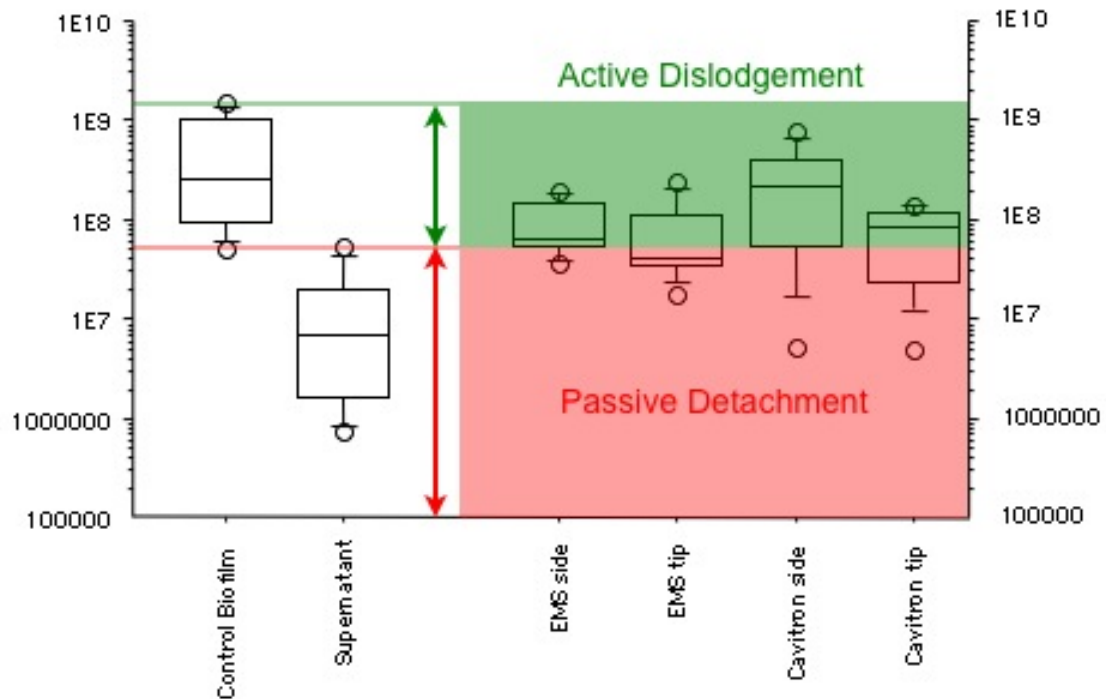
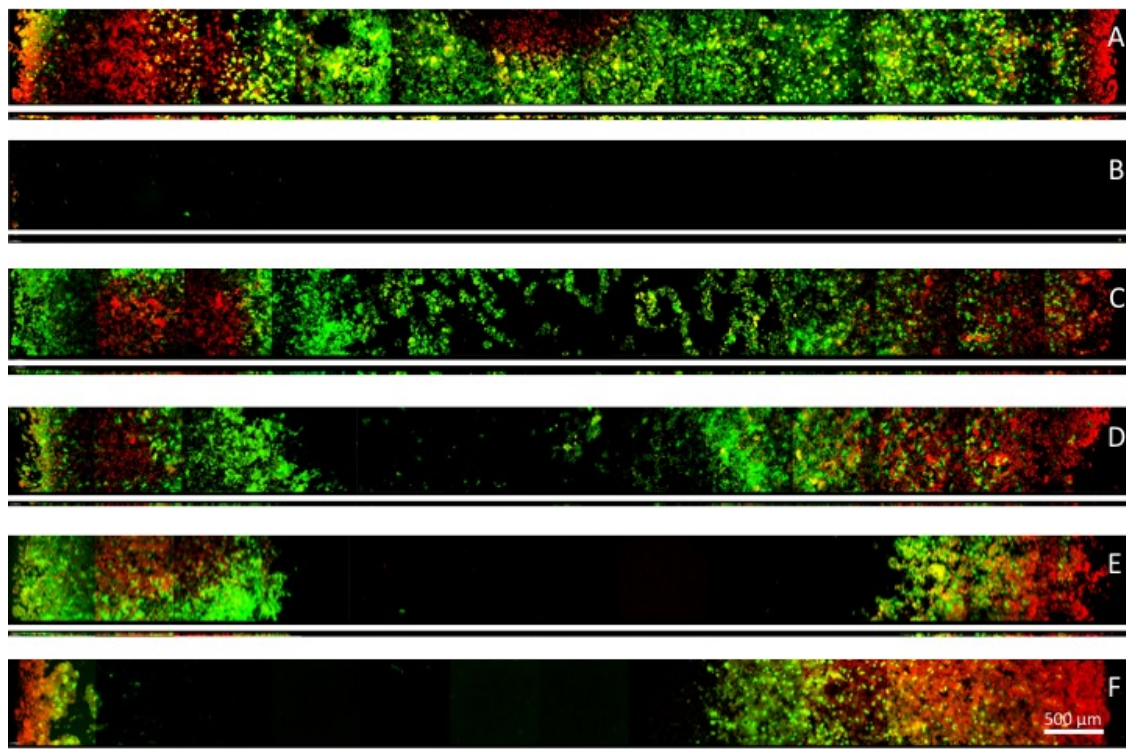


Fig. 6.5.: Vergleich der CFUs bei verschiedenen Behandlungen: Spontan losgelöster Biofilm (rot), und manuell oder mit Ultraschall entfernter Biofilm (grün).

Einfluss von Ultraschall-Scalern auf die Elimination von supragingivalen in vitro Biofilmen (Versuch III)



A: Kontrolle; B: Scaler manuell; C: Sc.1-Top; D: Sc.1-Side; E: Sc.2-Top; F: Sc.2-Side

Fig. 6.6.: Konfokale Aufnahmen von in vitro Biofilmen vor und nach Behandlung mit Ultraschall-Scalern. Die Biofilme wurden mit dem Live/Dead Viability Kit gefärbt. Lebende Zellen erscheinen grün, tote Zellen rot. A: Kontrolle ohne Behandlung; B: Kontrolle nach manueller Entfernung des Biofilms; C: EMS-Scaler, Spitze; D: EMS-Scaler, Seite; E: Cavitron-Scaler, Spitze; F: Cavitron-Scaler, Seite. Längenmarker = 500 μm .

Literaturverzeichnis

- [1] T. Arabaci, Y. Çiçek, and C. Canakci, “Sonic and ultrasonic scalers in periodontal treatment: a review,” *International journal of dental hygiene*, vol. 5, no. 1, pp. 2–12, 2007.
- [2] A. Badersten, R. Nilvéus, and J. Egelberg, “Effect of nonsurgical periodontal therapy,” *Journal of clinical periodontology*, vol. 8, no. 1, pp. 57–72, 1981.
- [3] T. Dezelic, B. Guggenheim, and P. R. Schmidlin, “Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch,” *Oral Health Prev Dent*, vol. 7, no. 1, pp. 47–53, 2009.
- [4] T. F. Flemmig, G. J. Petersilka, A. Mehl, R. Hickel, and B. Klaiber, “Working parameters of a magnetostrictive ultrasonic scaler influencing root substance removal in vitro,” *J. Periodontol.*, vol. 69, no. 5, pp. 547–553, Mai 1998.
- [5] B. Guggenheim, E. Giertsen, P. Schüpbach, and S. Shapiro, “Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque,” *Journal of dental research*, vol. 80, no. 1, pp. 363–370, 2001.
- [6] B. Guggenheim, M. Guggenheim, R. Gmur, E. Giertsen, and T. Thurnheer, “Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology,” *Caries Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 212–222, 2004.
- [7] T. Hehl, “Ultraschall,” in *Angewandte Physik*, 2003, pp. 168–179.
- [8] S. Lea, G. Landini, and A. Walmsley, “Vibration characteristics of ultrasonic scalers assessed with scanning laser vibrometry,” *Journal of dentistry*, vol. 30, no. 4, pp. 147–151, 2002.
- [9] S. C. Lea, G. Landini, and A. D. Walmsley, “The effect of wear on ultrasonic scaler tip displacement amplitude,” *Journal of clinical periodontology*, vol. 33, no. 1, pp. 37–41, 2006.
- [10] S. C. Lea, B. Felver, G. Landini, and A. D. Walmsley, “Three-dimensional analyses of ultrasonic scaler oscillations,” *Journal of clinical periodontology*, vol. 36, no. 1, pp. 44–50, 2009.

- [11] S. Lea, G. Landini, and A. Walmsley, "Assessing the vibrations of dental ultrasonic scalers," *Journal of sound and vibration*, vol. 271, no. 3, pp. 1113–1120, 2004.
- [12] Å. Leonhardt, C. Bergström, L. Krok, and G. Cardaropoli, "Microbiological effect of the use of an ultrasonic device and iodine irrigation in patients with severe chronic periodontal disease: a randomized controlled clinical study," *Acta Odontologica*, vol. 65, no. 1, pp. 52–59, 2007.
- [13] P. Müller, B. Guggenheim, T. Attin, E. Marlinghaus, and P. R. Schmidlin, "Potential of shock waves to remove calculus and biofilm," *Clinical oral investigations*, vol. 15, no. 6, pp. 959–965, 2011.
- [14] P. Müller, B. Guggenheim, and P. R. Schmidlin, "Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro," *European journal of oral sciences*, vol. 115, no. 1, pp. 77–80, 2007.
- [15] N. Oulahal, A. Martial-Gros, M. Bonneau, and L. Blum, "Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to 'Escherichia coli milk' and 'Staphylococcus aureus milk' biofilms," *Biofilms*, vol. 1, no. 1, pp. 65–73, 2004.
- [16] S. Renvert, M. Wikström, G. Dahlén, J. Slots, and J. Egelberg, "Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 17, no. 6, pp. 345–350, 1990.
- [17] R. J.F. and S. Zimmer, *Prophylaxe und Präventivzahnmedizin*. Thieme, Stuttgart, 2002.
- [18] L. Sbordone, L. Ramaglia, E. Gulletta, and V. Iacono, "Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis," *Journal of Periodontology*, vol. 61, no. 9, pp. 579–584, 1990.
- [19] S. Shapiro, E. Giertsen, and B. Guggenheim, "An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses," *Caries research*, vol. 36, no. 2, pp. 93–100, 2002.
- [20] T. Thurnheer, J. Van Der Ploeg, E. Giertsen, and B. Guggenheim, "Effects of streptococcus mutans gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro," *Caries research*, vol. 40, no. 2, pp. 163–171, 2006.
- [21] J. Tunkel, A. Heinecke, and T. Flemmig, "A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 29, no. s3, pp. 72–81, 2002.

- [22] A. D. Walmsley, S. C. Lea, G. Landini, and A. J. Moses, “Advances in power driven pocket/root instrumentation,” *Journal of clinical periodontology*, vol. 35, no. s8, pp. 22–28, 2008.
- [23] A. D. Walmsley, S. C. Lea, B. Felver, D. C. King, and G. J. Price, “Mapping cavitation activity around dental ultrasonic tips,” *Clinical oral investigations*, vol. 17, no. 4, pp. 1227–1234, 2013.

Glossar

aerob	mit Sauerstoff belüftet
anaerob	unter Sauerstoff-Abschluss
CFU	Colony Forming Units (Deutsch: KBE = Kolonie-bildende Einheiten)
CLSM	konfokale Lasermikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy)
Debridement	Entfernen von Plaque und Zahnstein
FUM	Fluid Universal Medium
inkubieren	bebrüten
in vitro	im Glas (ablaufend)
Kavitation	Bildung und Auflösung von Dampfblasen durch Ultraschall in Flüssigkeiten
Pellikel	Zahnoberhäutchen (Film aus Proteinen des Speichels)
OMZ	Orale Mikrobiologie und Immunologie Zürich
SPSS	Statistik Software
subgingival	unter dem Zahnfleisch (lat. gingiva: Zahnfleisch)
supragingival	oberhalb des Zahnfleisches

A. Anhang

Material

Discs

gesinterte Hydroxyapatit Discs (\varnothing 9 mm) > Clarkson
Chromatography
Products, Inc., South Williams-port, PA 17702, USA

Stämme

OMZ 918, *Streptococcus mutans*
OMZ 493, *Veillonella dispar*
OMZ 596, *Fusobacterium nucleatum*
OMZ 607, *Streptococcus oralis*
OMZ 745, *Actinomyces oris*
OMZ 110, *Candida albicans*

Discnummern

	Disc Nr.
Kontrolle mit Überstand	1 / 2 / 3
Kontrolle für CLSM Mikroskopie	4 / 5 / 6
EMS Top	7 / 8 / 9
EMS Side	10 / 11 / 12
Cavitron Top	13 / 14 / 15
Cavitron Side	16 / 17 / 18

Tab. A.1.: Zuordnung der Discs.

Material

50 ml konische Zentrifugen Röhrchen
10 ml, 5 ml, 1 ml Pipetten
Plastik Petrischalen
24-Schacht-Mikrotiter-Platte
Pinzetten
sterile Handschuhe
Eis
Diverses Labor Material

Ausrüstung

clean bench - Sterile Arbeitsbank
Inkubator (37°C, aerob + 10 % CO₂)
anaerobe Kammer (37°C)
vortexer - Schüttler
spiral dilutor - Verdünner
Photometer
Ultraschall (Branson B-12)
Vakuumpumpe

Medien

Angaben für 250 ml

1. FUM + 0.3 % Glucose in Sörensens Puffer (pH 7.2)

Lös. A) 2.5 g Tryptone (Difco, 0123-01-1)
 1.25 g Hefeextrakt (Difco, 0127-01-7)
 250 mg KNO₃
 500 mg NaCl
 250 µl Hemin Stammlösung*
 200 ml Sörensens Puffer
 >> autoklavieren 20' / 121°C

Lös. B) 750 mg Glucose
 125 mg Cysteine · HCl
 125 mg Na₂CO₃
 12.5 ml Sörensens Puffer
 >> Filter Sterilisation

RTF Lös.) 18.75 ml RTF 1 Stammlösung*
 500 µl Menadione Stammlösung*
 18.75 ml RTF 2 Stammlösung*
 >> Filter Sterilisation

*Stammlösung, siehe „Reagenzien“.

2. FUM + 0.15 % Glucose + 0.15 % Saccharose in Sörensens Puffer

- gleich wie bei 1.), mit den folgenden Zugaben:
 375 mg Glucose
 375 mg Saccharose

3. Speichel

- zwischen 9 und 10 morgens gesammelt (mind. 1.5 h nach dem Zähneputzen)
- in 500 ml Pyrex Flaschen sammeln und bei -20°C aufbewahren.

- zentrifugieren bei 27'500 x g, 4°C, 30 min
- den Überstand bei 60°C erhitzen, 30 min
- zentrifugieren bei 27'500 x g, 4°C, 30 min
- microbiologische Kontrolle auf Blutagarplatten
- 50 ml Teilproben bei -20°C aufbewahren
- für den Biofilm wird eine 1:1 Verdünnung in H₂O + 25 %
physiol. NaCl Lösung benutzt

4. **Columbia Blutagarplatten**

(Oxoid, CM 331 + 5 % menschliches Blut)

5. **Mitis Salivarius Agarplatten**

(Difco, 0298-17-2 + 1 ml of 1 % Na₂ Te Lösung)

6. **Obligat anaerobe Agarplatten**

(BAG, 7621 > Produzent : lab m, UK)

+ erythromycin (1 mg/l) Sigma, E-6376 / gelöst in dest. H₂O

+ vancomycin (4 mg/l) Lilly, 657 / gelöst in dest. H₂O

+ norfloxacin (1 mg/l) Sigma, N-9890 / gelöst in absolutem Ethanol

7. **Biggy Agarplatten**

(Difco, 0635-17-4)

Reagenzien

- physiologische NaCl Lösung
- Live/Dead BacLight Viability Kit (Molecular Probes Inc.)
bei -20°C aufbewahren.
- Sörensens Puffer, pH 7.2
 - Stammlösung 1: KH₂PO₄ 9.078 g/l
 - Stammlösung 2: Na₂HPO₄ · 2 H₂O 11.876 g/l
 - Mischverhältnis: 330 ml Stammlösung 1 + 670 ml Stammlösung 2
- RTF 1
 - K₂HPO₄ 6 g
 - dest. H₂O 1000 ml

- RTF 2

- NaCl 12 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12 g
- KH_2PO_4 6 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g
- dest. H_2O 1000 ml

- Hemin Lösung

- KOH, 0.1N 100 ml
- Ethanol 50 ml
- dest. H_2O 50 ml
- Hemin chloride 200 mg

- Menadion Stammlösung:

- Menadion 25 mg
- Ethanol 50 ml